



⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Off enlegungsschrift**  
⑩ **DE 40 14 540 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**A 61 K 39/395**

⑳ Akt nz ich n: P 40 14 540.9  
㉑ Anmeldetag: 7. 5. 90  
㉒ Offenlegungstag: 14. 11. 91

DE 40 14 540 A 1

㉑ Anmelder:  
Tschaikowsky, Klaus, Dr., 8520 Erlangen, DE

㉒ Erfinder:  
gleich Anmelder

㉓ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE 35 43 348 A1  
DD 2 11 553  
EP 3 27 169 A2  
EP 1 06 495 A2  
EP 1 04 101 A1  
WO 90 00 562 A1  
WO 85 05 640 A1

KUBBIES, Manred;

et.al.: Complex Ca<sup>2+</sup> flux inhi- bition as primary  
mechanism of staurosporine-in- duced impairment  
of T cell activation. In: Eur.J.Immunol., 1989, 19(8),  
19:1393-1398;

- ISHIHARA, Noriko;

et.al.: STABILIZATION OF BLOOD PLATELET  
MICROTUBULAR SYSTEM BY STAUROSPORINE.  
In: Life Science, Vol.44, 1989, pp.1309-1316;

- BROWN;

Beverly A.;

et.al.: Conjugation of Metal- logthionein to a Murine  
Monoclonal Antibody. In: ANALYTICAL  
BIOCHEMISTRY 172(1), 1988, 22-28;

- RACCHETTI, Gabriella;

et.al.: PRODUCTION OF MONO- CLONAL  
ANTIBODIES TO CALCITONIN AND DEVELOPMENT  
OFA TWO-SITE ENZYME IMMUNOASSAY. 24(11),  
1987, S.1169-1176;

- BJORGE, Jeffrey D.;

et.al.: Inhibition of stimulus-dependent epidermal  
growth factor receptor and

transforming growth factor- $\alpha$  m RNA accumulation  
by the protein kinase C inhibitor staurosporine. In:  
FEBS.Lett. 243(2), 1989, S.819-825;

- TWOMEY, B.;

et.al.: The effect of putativ protein kinase C  
inhibitors, K252a and staurosporine, on the human  
neutrophil respiratory burst activated by both  
receptor stimulation and post-receptor mechanisms.  
In: Brit.J.Pharmacol., 100(4) , 1990, S.819-825;

- BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH  
COMMUNI- CATIONS, Vol.164, No.1, 1989,  
S.339-344;

- Chem. Abstracts, Nr.172473h, 111(19), 1989, S.578;

㉔ Immunkonjugate zur Prophylaxe und Therapie von Organschäden bei entzündlichen Prozessen

㉕ Immunkonjugate zur Prophylaxe und Therapie von Organ-  
schäden bei entzündlichen Prozessen.

Zur Verhinderung und zur Reduktion von organschädigenden  
Entzündungsreaktionen durch Zellen des retikoloendothelia-  
len Systems werden Immunkonjugate aus monoklonalen  
Antikörpern, Kopplungsreagenzien und bestimmten Hemm-  
stoffen eingesetzt, die im Gegensatz zum bisherigen Stand  
der Technik in der Lage sind diese Zielzellengruppen (Leuko-  
zyten, Endothelien) spezifisch zu beeinflussen, auch wenn  
die Entzündungsreaktion bereits in Gang gekommen ist.

Nach Bindung des Immunkonjugates an die Zielzelle und  
nachfolgender Aufnahme und Freisetzung eines Hemmstof-  
fes in das Zellinnere werden diese Zellen (Leukozyten,  
Endothelien) spezifisch in ihrer Funktion und Interaktion  
gehemmt, woraus eine Verminderung von entzündungsbe-  
dingten Organschäden resultiert.

DE 40 14 540 A 1

## Beschreibung

## Titel

Immunkonjugate zur Prophylaxe und Therapie von Organschäden bei entzündlichen Prozessen.

## Gattung

Die Erfindung gehört zum Gebiet der Immunologie. Sie bezieht sich auf die Entwicklung und den Einsatz von konjugierten Antikörpern (Immunkonjugaten), die mit einer hohen Selektivität bestimmte Zielzellen (Leukozyten, Endothelzellen) in ihrer Funktion und Stoffwechselaktivität beeinflussen.

Die Immunkonjugate dieser Erfindung interferieren mit der Leukozyten-Endothel-Interaktion und der Leukozyten-/Endothelzellfunktion und sollen auf diese Weise einen Großteil der organschädigenden Wirkungen dieses Teils des retikulo-endothelialen Systems bei entzündlichen Prozessen insbesondere bei einer Sepsis verhindern.

## Stand der Technik

Das Auftreten einer Sepsis und ein damit assoziiertes multiples Organversagen gehören zu den meistgefürchteten Komplikationen nach operativen Eingriffen. Infektionen, Trauma, Verbrennungen, Pankreatitis und Aspiration, deren Behandlung ein noch ungelöstes Problem darstellt.

Trotz intensivmedizinischer Fortschritte konnte weder die Inzidenz noch die hohe Mortalität dieser Komplikationen in den letzten Jahren vermindert werden. Bei einer steigenden Anzahl von Operationen an Patienten mit hohem Alter und Risiko, in Kombination mit ausgedehnten Eingriffen, muß daher mit einer Zunahme septischer Komplikationen gerechnet werden, wenn es nicht gelingt, bessere Methoden der Früherkennung und eine spezifischere Therapie zu entwickeln.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden zwar einige neue, erfolgversprechende Therapiekonzepte eingeführt, aber die Mortalitätsrate bei Sepsis mit Organversagen blieb mit circa 60–80% nach wie vor hoch. Die gegenwärtig zur Verfügung stehenden nicht chirurgischen, routinemäßig eingesetzten Behandlungskonzepte der postoperativen Unterstützung von Atmung (Beatmung), Kreislauf (Katecholamine), Ernährungs-/Infusionstherapie und Antibiose können als weitgehend ausgereizt angesehen werden.

Der Einsatz generell immunsuppressiver Stoffe, die in das Immunsystem hemmend oder regulierend eingreifen (z. B. Kortikosteroide, Acetylsalicylsäure) ist verbreitet und zeigt die Bedeutung der Immunsuppression in der Behandlung von Intensivpatienten. Bei parenteraler Verabreichung dieser Medikamente rufen sie jedoch durch ihre unspezifische Wirkung vielfältige Organstörungen hervor, so daß insbesondere der Einsatz von Kortikosteroiden nach heutigen Erkenntnissen als obsolet gilt (Bihari DJ et al. (1982) B J Hosp Med (October):323). Aber auch der Nutzen von neueren Therapien wie PEEP-Beatmung (Pepe P et al. (1984) N Engl J Med 311:281), Infusionen von Prostaglandinen PGE<sub>1</sub>/PGI<sub>2</sub> (Brockmann DC et al. (1986) Am Rev Respir Dis 134:885; Bihari DJ et al. (1988) Intensive Care Med 15:2), Hämofiltration und Plasmapherese konnte bisher nicht durch prospektive Studien belegt werden.

Die Gründe für die bisher noch unbefriedigenden Therapieerfolge in der Behandlung einer Sepsis liegen zum einen in der noch unvollständigen Kenntnis der auslösenden Pathomechanismen in ihrem zeitlichen Ablauf und zum anderen in den bisher nur beschränkt zur Verfügung stehenden Möglichkeiten darin spezifisch einzugreifen.

Die initialen Triggermechanismen bestehen im wesentlichen aus Veränderungen der Vasomotorik und der Kapillarpermeabilität, hervorgerufen durch die Freisetzung von Eicosanoiden (Demling RH et al. (1981) Am J Physiol 240:H348) – vor allem von Thromboxan und Leukotrienen –, Komplementspaltprodukten (Heideman M (1979) J Surg Res 26:670) und Histamin (Brigham KL et al. (1980) J Appl Physiol 49:516). Diese Frühphasenreaktionen sind reversibler Natur und können daher abgemildert werden durch die Gabe von Cyclooxygenasehemmern (Adams T Jr et al. (1982) Circ shock 9:481; Hutmeyer PC et al. (1982) Circ Res 50:688), Leukotrien-antagonisten und Antihistaminika (Brigham KL et al. (1980) J Appl Physiol 49:516).

Die Ausbildung irreversibler Endothel- und Parenchymschädigungen jedoch, die zum Vollbild therapieresistenter Organversagen führen, setzt nach heutiger Erkenntnis die Anwesenheit von aktivierten Leukozyten voraus.

Eine Schlüsselstellung nehmen dabei sequestrierte Granulozyten und gewebsständige Makrophagen ein, die durch eine überschießende, lokale Freisetzung von lysosomalen Enzymen, toxischen Sauerstoffradikalen und Entzündungsmediatoren (Interleukin-1, TNF) das komplexe, gewebszerstörende Entzündungsgeschehen induzieren und perpetuieren.

Das System der mononukleären Phagozyten in Leber und Lunge ist primär verantwortlich für die Klärung des Blutes von zirkulierenden Fremdpartikeln (z. B. Bakterien, Endotoxin).

Aktivierte Makrophagen stellen somit ein primäres Induktionssystem dar, um neutrophile Granulozyten – die zweite zelluläre Komponente der unspezifischen Immunabwehr – zu rekrutieren und zu aktivieren.

Die Sequestrierung und das "Sticking" aktivierter Granulozyten in den Lungenkapillaren ist, wie eine Fülle von Studien belegt, eine entscheidende Grundvoraussetzung für die Ausbildung des Vollbildes eines akuten Lungenversagens (Tate RM et al. (1983) Am Rev Respir Dis 128:552; Meyrick B et al. (1983) Lab Clin Invest 48:458; Worthen GS et al. (1987) Am Rev Respir Dis 136:19; Weiland JE et al. (1986) Am Rev Respir Dis 133:218; Warshawski FJ et al. (1986) Am Rev Respir Dis 133:797).

Die Arbeitsgruppen von Brigham, Malik und Hohn haben eindrucksvoll demonstriert, daß Tiere, die vor der

Gabe von Endotoxin oder aktiviertem Komplement bzw. vor einer Mikroembolisation neutropenisch gemacht wurden, nicht mit einer Zunahme der Permeabilität und des pulmonal-arteriellen Druckes reagieren und kein letales Lungenversagen entwickeln (Barie PS et al. (1982) *Am Rev Respir Dis* 126:904; Heflin AC Jr et al. (1981) *J Clin Invest* 68:1253; Johnson A et al. (1982) *J Appl Physiol* 52:155; Hohn DC et al. (1980) *Surgery* 88:48). Für die massive, anhaltende Sequestrierung von Granulozyten bei septischen Prozessen sind zwei ineinandergreifende Pathomechanismen verantwortlich:

Ein vermehrter, zielgerichteter Einstrom von Leukozyten in den Entzündungsherd (Chemotaxie) und eine gesteigerte Adhärenz der Leukozyten am Gefäßendothel (Sticking).

Der chemotaktische Einstrom wird durch Faktoren (Chemotaxine) wie z. B. Komplementspaltprodukt C5a und Leukotrien LTB<sub>4</sub> vermittelt, die bei entzündlichen und traumatischen Prozessen gebildet werden.

Am zweiten Pathomechanismus in der Genese sepsis-induzierter Organversagen, dem Leukozytensticking im kapillären Strombett, sind folgende Faktoren ursächlich beteiligt:

1. Eine reduzierte Strömungsgeschwindigkeit des Blutes, als Folge von initialen Störungen der Vasomotorik, von Mikrothromben oder — im Sinne eines circulus vitiosus — vom Leukozytensticking selbst (Lawrence MB et al. (1987) *Blood* 70:1284).
2. Ein verminderter, intrazellulärer Gehalt an c-AMP und eine dadurch reduzierte Cytosolviskosität in Reaktion auf Entzündungsmediatoren (Chopra J et al. (1988) *Am Rev Respir Dis* 138:915).
3. Die Expression von adhärenzfördernden Glykoproteinstrukturen an der Granulozyten-/Monozytenmembran, insbesondere des CD11/w18-Antigens (CR3-Rezeptor), das neben dem Kontakt zum Kapillarendothel auch eine gesteigerte Opsonierung C3b<sub>i</sub>-beladener Partikel vermittelt (Pohlmann TH et al. (1986) *J Immunol* 136:4548).
4. Die Expression von adhärenzfördernden Glykoproteinstrukturen an der Endothelzellmembran, ebenfalls in Reaktion auf Entzündungsmediatoren (TNF, Interleukin-1, GM-CSF) (Bevilacqua MP et al. (1985) *J Clin Invest* 76:2003).

Die letzten beiden pathogenetisch relevanten Faktoren, die adhärenzvermittelnden Glykoproteinstrukturen an der Zellmembran, bilden gleichsam die eigentlichen Kontaktbrücken zwischen Leukozyten und Endothel.

An der Zellmembran von Endothelien *in vitro* wurden adhärenzvermittelnde Glykoproteine nachgewiesen, die nach einer Stimulation durch Mediatoren (z. B. IL-1, TNF) *de novo* synthetisiert und mit einer lag-phase von 6—8 Stunden an der Zellmembran exprimiert werden (Bevilacqua MP et al. (1985) *J Clin Invest* 76:2003).

Auf der Zellmembran von Leukozyten ist vor allem das CD11/w18-Antigen eine wichtige Glykoproteinstruktur über die eine Adhärenz der Leukozyten am Endothel vermittelt wird. Das CD11/w18-Antigen — auch als CR3-Rezeptor bezeichnet — ist ein Heterotrimer aus CD11 und CDw18 Antigenen, das permanent an der Zellmembran von Granulozyten und Monozyten exprimiert ist und — ähnlich wie der FMLP-Rezeptor — in Reaktion auf Entzündungsmediatoren (z. B. TNF) innerhalb weniger Minuten vermehrt werden kann (Socinski MA et al. (1988) *Blood* 72:691; Berger M et al. (1984) *J Clin Invest* 74:1566).

Nach Untersuchungen *in vitro*, ist die Expression des CD11/w18-Antigens auf der Granulozyten- und Monozytenmembran eine Grundvoraussetzung für die Aggregation von Leukozyten und ihre Adhärenz an endothelialen Monolayern (Beatty PG et al. (1984) *Lancet* 1:535; Harlan JM et al. (1985) *Blood* 66:167; Schwartz BR et al. (1985) *Blood* 65:1553).

Monoklonale Antikörper gegen Epitope dieses CD11/w18-Antigens können z. B. die Adhärenz von Granulozyten am Endothel um 70—90% hemmen (Marks RM et al. (1989) *Nature* 339:314).

In eigenen Untersuchungen hat der Antragsteller nachweisen können, daß die CD11b-Expression durch C5a und PMA (Phorbol-myristat-acetat) stimuliert wird, und daß die Adhärenz von Neutrophilen an plasmabeschichteten Plastikoberflächen durch monoklonale Anti-CD11b-Antikörper um mehr als 50% reduziert werden kann. An Tiermodellen konnte man zeigen, daß durch die Gabe von monoklonalen Anti-CDw18-Antikörpern (MoAb 60.3) die Granulozytenadhärenz auch *in vivo* um 80—90% vermindert wird (Arfors KE et al. (1987) *Blood* 69:338). Durch die Vorgabe von monoklonalen Anti-CDw18 (MoAb 60.3) gelang es erstaunlicherweise auch die Letalität in einem hämorrhagischen Schockmodell (Kaninchen) hoch signifikant zu verringern (Vedder NB et al. (1988) *J Clin Invest* 81:939).

Durch den Einsatz dieser leukozytenspezifischen, monoklonalen Antikörper könnte somit erreicht werden, daß Leukozyten, die durch chemotaktische Stimuli (s. o.) in einen Infektionsherd gelockt werden, nicht über das CD11/w18-Antigen als Kontaktbrücke am Gefäßendothel des entzündeten Organs haften können.

Dadurch würde das Ausmaß der zellulären Infiltration mit Leukozyten in diesen Organen und die resultierenden Entzündungsreaktionen, die eine lokale Gewebeschädigung hervorrufen können, deutlich reduziert werden.

Es wurden neben dem CD11/w18-Antigen noch weitere Glykoproteinstrukturen auf Leukozyten beschrieben, die eine Endotheladhärenz durch eine Interaktion mit gewebespezifischen Endotheldeterminanten vermitteln können (Lewinsohn et al. (1987) *J Immunol* 138:4313).

Diese verschiedenen, adhärenzfördernden Glykoproteinstrukturen an der Zellmembran des Endothels und der Leukozyten können daher nur durch die Gabe von mehreren monoklonalen Antikörpern ausreichend neutralisiert werden.

Außerdem wird sich bei Behandlungsbeginn in der Klinik nur ein Teil der Patienten im Frühstadium einer Sepsis befinden. Bereits ablaufende Entzündungsreaktionen des Endothels oder der Leukozyten, die schon am Gefäßendothel adhären oder das Gewebe infiltriert haben, können somit weder mit Hilfe der bisher verfügbaren und oben beschriebenen Antikörper noch mit anderen spezifisch an den Leukozyten oder am Endothel wirksamen Methoden verhindert oder supprimiert werden.

## Aufgabe und Lösung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, sowohl die Adhärenz von Leukozyten im Entzündungsherd und damit verbundene Entzündungsreaktionen zu hemmen, als auch spezifisch die Produktion und Freisetzung von schädlichen Entzündungsfaktoren (lysosomale Enzyme, Sauerstoffradikale, Eicosanoide, Zytokine) durch bereits adhärenzte Leukozyten und entzündlich veränderte Gefäßendothelien zu reduzieren.

Diese Erfindung soll also entzündliche Prozesse, insbesondere bei einer Sepsis, durch eine gezielte Immunsuppression, sowohl prophylaktisch und im Frühstadium, als auch im bereits voll ausgebildeten Entzündungsgeschehen vermindern.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß mit Hilfe von Immunkonjugaten gemäß Patentanspruch, die spezifisch gegen Membranantigene von Leukozyten oder Endothelzellen sind, ein Hemmstoff (Proteinkinase c Inhibitor oder ein Calcium/Calmodulin-antagonist) überwiegend zu diesen Zielzellen gebracht wird, der nach Aufnahme in diese Zielzellen deren Produktion und Freisetzung von Entzündungsmediatoren verringern soll.

Die Immunkonjugate dieser Erfindung unterscheiden sich von anderen, bisher bekannten Immunkonjugaten zur Tumorbekämpfung (z. B. Moolten FL et al. (1975) J Natl Cancer Institute 55:473; Thorpe PE et al. (1978) Nature 271:752) durch einen völlig neuartigen Anwendungszweck, durch die verwendeten Hemmstoffe bzw. Toxine und die dadurch erreichte Wirkung und beeinflusste Zielzellenart.

Die Bezeichnung "Immunkonjugat" und der Gegenstand dieser Erfindung bezieht sich auf kovalente Verbindungen aus monoklonalen Antikörpern, Crosslinkern und Hemmstoffen, die in der Lage sind, Leukozyten oder Endothelzellen spezifisch in ihrer Funktion zu beeinflussen und/oder in der Leukozyten-Endothel-Interaktion zu hemmen und durch die folgende Formel charakterisiert werden können:



Die Bezeichnung "moAb" (monoklonale Antikörper) bezieht sich dabei auf glykosylierte Proteine, die als Immunglobuline bezeichnet werden und sich spezifisch mit Antigenen verbinden. Sie bezieht sich auf alle Klassen von Immunglobulinen (IgG, IgM, IgD, IgA oder IgE) und auf alle Fragmente und chemischen Modifikationen von Immunglobulinen (z. B. Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fv), die leukozyten- oder endothel-assoziierte Membranantigene spezifisch binden.

Die verwendeten Antikörper dienen dabei gleichsam als Vehikel, um den kovalent angekoppelten Hemmstoff zu bestimmten Zielzellen (Leukozyten, Endothelien) zu bringen und die intrazelluläre Aufnahme (Phagozytose) des Hemmstoffes in die Zielzelle zu fördern.

Das Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern durch die Hybridom-Technologie ist wohlbekannt und erfolgt nach der Methode von Köhler und Milstein (1975) Nature 356:497 und nach Levy und Dilley (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75:4211.

Dieser Erfindung entsprechend, sollen für diese Immunkonjugate bevorzugt Antikörper verwendet werden, die spezifisch für Leukozyten- oder Endothel-membranantigene sind, die an der Leukozyten-Endothel-Interaktion beteiligt sind. Dazu gehören z. B. monoklonale Antikörper bzw. ihre Fab-Fragmente (s. o.) gegen das CD11/w18-Antigen auf Granulozyten und Monozyten. Die Verwendung von Fab-Fragmenten ist bei der Herstellung von Immunkonjugaten gemäß dieser Erfindung zu bevorzugen, da sie im Vergleich zu kompletten Antikörpern aufgrund des fehlenden Fc-Stückes kein Komplement aktivieren, nicht über den Fc-Rezeptor an Zellmembranen binden und eine geringere Fremdanitgenität beim Empfänger auslösen.

"Leukozyten" sind weiße Blutzellen, die Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten umfassen.

Die Bezeichnung "Antigen" bezieht sich auf Glykoprotein- oder Glykopeptid-strukturen, die auf der Zellmembran von Leukozyten oder von Endothelzellen exprimiert sind, oder nach einer Stimulation dieser Zellen exprimiert werden.

Unter "CrosslinkerR" werden zweiwertige organische Reste von Kopplungsreagenzien verstanden, die in der Lage sind, Antikörper und Hemmstoff durch zwei, zum Teil unterschiedliche, funktionelle chemische Gruppen kovalent so zu koppeln, daß die Spezifität des Antikörpers erhalten bleibt und der Hemmstoff erst intrazellulär nach einer Freisetzung aus dem Immunkonjugat wirksam wird. Das heißt, die Kopplung zwischen Antikörper und Hemmstoff soll während der Zirkulation im Blut so lange stabil bleiben, bis die Immunkonjugate nach Bindung an die entsprechenden Membranrezeptoren der Zielzellen von diesen Zellen aufgenommen sind. Der Hemmstoff soll somit ganz überwiegend erst nach Aufnahme des Immunkonjugates in der Zielzelle unter der Einwirkung von lysosomalen Enzymen freigesetzt werden.

Um die Nebenwirkungen bei einem parenteralen Einsatz dieser Immunkonjugate durch unspezifisch aufgenommene Hemmstoffe z. B. in Leber und Niere möglichst gering zu halten, ist es vorteilhaft, die Hemmstoffe gemäß Patentanspruch chemisch so zu derivatisieren, daß ihre Halbwertszeit im Blut auf Minuten bis Stunden begrenzt ist und unterhalb der Halbwertszeit der kovalenten Bindung an die verwendeten Crosslinker liegt.

Die "CrosslinkerR" können z. B. von Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC), m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimid-ester (MBS), Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat (SMPB), N,N'-(1,2-Phenyl)dimaleimid, N,N'-(1,4-Phenyl)dimaleimid, 4,4'-bis(Maleoyl-amino)-azobenzol, bis(N-Maleimidomethyl)-ester, N,N'-Alkylenbis(Bromacetamid) oder N,N'-Alkylen-bis(Jodacetamid) abgeleitet sein.

"F<sub>1</sub>" und "F<sub>2</sub>" bezeichnen die Atome, über die das Immunglobulin "moAb" bzw. der "Hemmstoff" kovalent an den "CrosslinkerR" gebunden wird. Bei der vorzugsweisen Anwendung eines heterobifunktionellen Crosslinkers, mit zwei unterschiedlichen funktionellen Bindungsgruppen (um die Bindung von moAb-moAb-Konjugaten oder

Hemmstoff-Hemmstoff-Konjugaten zu reduzieren), kann z. B.  $F_1$  ein Schwefelatom aus einer durch Reduktion von Disulfidbrücken resultierende Sulfhydrylgruppe des moAb sein und  $F_2$  ein zur Amid-Bindung dienendes Stickstoffatom eines Staurosporine-derivates darstellen (s. Fig. 1).

$F_1$  kann aber auch ein Stickstoffatom sein, wenn die Kopplung an den Crosslinker über eine freie Aminogruppe des moAb erfolgt.

Die Verwendung von heterobifunktionellen Crosslinkern gestattet die schrittweise Herstellung von Immunkonjugaten nach bekannten Methoden, wobei z. B. zuerst der Hemmstoff und dann das moAb an den Crosslinker gebunden wird (Lomants A J et al. (1976) Arch Biochem Biophys 167:311; Anjaneyula PSR et al. (1987) Int J Pep Pro Res 30:117; Partis MD et al. (1983) J Pro Chem 2:263; Weltman JK et al. (1983) Bio Techniques 1:148).

Sollen bei Verwendung von heterobifunktionellen Crosslinkern, die sowohl mit freien Amino- als auch mit Sulfhydrylgruppen reagieren können, der moAb über eine freie Aminogruppe und der Hemmstoff über die freie Sulfhydrylgruppe gebunden werden, müssen im Immunglobulin moAb die möglichen freien Sulfhydrylgruppen z. B. durch N-Äthyl-maleimid geblockt werden. Soll die Bindung des Immunglobulins moAb an den Crosslinker über eine freie Sulfhydrylgruppe erfolgen, müssen im moAb freie SH-Gruppen durch eine Reduktion von Disulfid-Brücken erzeugt werden. Die Anzahl der frei verfügbaren SH-Gruppen kann z. B. nach Reaktion mit Ellman's Reagenz berechnet werden. Die Kopplungsreaktion an Maleimid-Crosslinker erfolgt dann unter neutralen bis leicht sauren pH-Bedingungen in einem SH-freien, entgasteten Puffer innerhalb von Minuten.

Das Endprodukt (Immunkonjugat) wird, nach Abschluß der zweiten Kopplungsreaktion, vom Reaktionsgemisch durch Gelfiltration oder Dialyse isoliert.

Da die Hemmstoffe eventuell auch direkt an die moAb, bzw. mehrere Hemmstoffmoleküle pro moAb gebunden werden können, wurden  $m = 0-1$  bzw.  $n = 1-10$  angegeben.

Mit "Hemmstoff" wird eine Substanz aus der Klasse von Enzyminhibitoren oder Antagonisten bezeichnet, die

1. die intrazelluläre Proteinkinase c hemmen, oder
2. einen intrazellulären Calciumanstieg oder das Calcium/Calmodulin-system inhibieren.

Proteinkinase c Inhibitoren sind z. B. Staurosporine und seine möglichen Derivate, sowie Polymyxin B, H-7 und Chlorpromazine.

Zu den Calcium/Calmodulin-inhibitoren gehören z. B. die Substanzen Compound 48/80, Calmidazolium, W-7, Verapamil, Trifluoperazine, TMB-8.

Die Substanz Staurosporine ist ein Alkaloid und wird von Pilzen der Gattung Streptomyces produziert. Staurosporine wurde erstmals durch seine antibiotischen Eigenschaften bekannt (Omura S et al (1977), J Antibiot 30:275) und gilt heute als der potenteste ( $IC_{50} = 2,7 \text{ nM}$ ) Proteinkinase c Inhibitor (Tamaoki T et al. (1986) Biochem Biophys Res Commun 135:387). Darüber hinaus wird berichtet, daß diese Substanz auch c-AMP-abhängige Proteinkinase hemmt.

Die intrazelluläre Aufnahme von circa 2000 Molekülen Staurosporine pro Zielzelle (10 picoliter) würden z. B. ausreichen, um die Aktivität der intrazellulären Proteinkinase c um circa 50% zu hemmen.

Durch die Hemmung dieses wichtigen Schlüsselenzyms wird nachfolgend die Aktivierung (Phosphorylierung) einer Reihe von weiteren Enzymen (NADPH-abhängige Membranoxidase, Phospholipase  $A_2$ , etc.) reduziert, die eine Produktion von Entzündungsmediatoren (Sauerstoffradikale, Leukotriene) induzieren.

Die so definierten Immunkonjugate dieser Erfindung sollen vorzugsweise am Menschen und Säugetieren bei geeigneter Indikation und unter Antibiotikaschutz des Empfängers, um die Ausbreitung einer bakteriellen Infektion zu verhindern, auf parenteralem Weg eingesetzt werden.

Dazu muß das Immunkonjugat in eine injizierbare Form (Lösung, Suspension, Emulsion) mit Hilfe von akzeptablen Trägersubstanzen (z. B. elektrolythaltige oder proteinhaltige wäßrige Lösungen oder ölhaltige Emulsionen) gebracht werden. Die Trägerlösung kann eventuell Additive enthalten (Puffer, Konservierungsstoffe), die die Haltbarkeit und die Isotonizität dieser Immunkonjugatlösung gewährleisten.

Die Immunkonjugate sind mit definierter Konzentration (z. B.  $0,1-50 \text{ mg/ml}$ ) in bestimmten Zeitintervallen zu infundieren. Die dadurch erreichte Konzentration im Blut soll dabei so hoch wie nötig sein, daß ausreichend viele Immunkonjugate von den zirkulierenden und adhärenen Zielzellen (Leukozyten, Endothel) aufgenommen werden, um den erwünschten Hemmeffekt zu erreichen, aber so niedrig wie möglich sein, um toxische Nebenwirkungen (Leber- und Nierenschäden) durch eine unspezifische Aufnahme des Hemmstoffes gering zu halten.

Der Einsatz von Immunkonjugaten dieser Erfindung ermöglicht somit erstmals fulminante Entzündungsreaktionen im Organismus, die zu Funktionsstörungen und Schädigungen von Organen führen können, selektiv und gezielt zu vermindern, durch eine Hemmung bestimmter Zellgruppen (Leukozyten, Endothel), die an der Ausbildung dieser Entzündungsreaktionen beteiligt sind.

## Beispiele

### Beispiel 1

#### Derivatisierung des Proteinkinase c Hemmstoffes Staurosporine

Das Alkaloid Staurosporine, dessen Strukturformel in Zeichnung 1 (s. Fig. 1) wiedergegeben wird, kann auf verschiedene Weise derivatisiert werden, um mit Hilfe eines Crosslinkers an einen monoklonalen Antikörper (oder ein Fragment davon) gegen Leukozyten- oder Endothelantigene gemäß dem unten aufgeführten Patentanspruch kovalent gekoppelt zu werden.

Angegeben wird hier (s. Fig. 1) die reduktive Aminierung der Carbonylgruppe von Staurosporine zum

primären Amin:

1 mol Staurosporine wird in 500 ml Methanol gelöst, das bei 10°C mit Ammoniak gesättigt wurde (etwa 5,5 mol). Im Schüttelautoklaven wird dann nach Zugabe von Raney-Nickel aus 30 g Legierung bei 90°C und 100 atm hydriert. Anschließend wird entspannt und der Katalysator abfiltriert und der überschüssige Ammoniak abdestilliert. Der Überstand wird angesäuert, die nichtbasischen Verbindungen ausgeäthert und die Ätherlösung anschließend über Ätzkali getrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wird über eine 20-cm-Vigreux-Kolonne destilliert.

Nach der Derivatisierung zum primären Amin muß geprüft werden, wie hoch die inhibierende Wirkung des erhaltenen Staurosporine-derivates auf die Proteinkinase c ist.

Staurosporine kann aber auch über eine mildere Reaktion (Cyanhydrinsynthese und anschließende Bouveault-Blanc Reduktion) aminiert werden, falls die Reaktionsbedingungen für das Staurosporine zu drastisch sind und die Aktivität des Endprodukts aufgrund dessen zu niedrig ist.

## Beispiel 2

Herstellung eines Immunkonjugates aus monoklonalem Anti-MAC1-Antikörper, SMPB und aminiertem Staurosporine

Ein aminiertes Staurosporine-derivat (s. Fig. 1) wird in einem ersten Reaktionsschritt über seine primäre Aminogruppe in einem leicht alkalischen Puffer (pH 7,0–7,5), der keine freien Sulfhydryl- oder Aminogruppen enthält, an die N-hydroxysuccinimid-Gruppe des heterobifunktionellen Crosslinkers Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat (SMPB) gekoppelt (s. Fig. 2). Das molare Staurosporine : SMPB Verhältnis im Reaktionsgemisch beträgt dabei etwa 1 : 10.

Überschüssiger Crosslinker wird vom konjugierten Staurosporine-derivat durch Gelfiltration entfernt.

Vor dem zweiten Reaktionsschritt muß der verwendete Anti-MAC1-Antikörper (Anti-CD11b) mit 25 mM Dithiothreitol (DTT) in 0,01 M Phosphat-Puffer (PBS) (pH 7,5) reduziert werden, um freie Sulfhydryl-Gruppen zu erzeugen. Der Überschuß an DTT wird ebenfalls durch Gelfiltration entfernt.

Der zweite Reaktionsschritt, die Thioätherbindung des Antikörpers an den Crosslinker SMPB über eine freie Sulfhydrylgruppe, zur Herstellung des kompletten Immunkonjugates erfolgt dann unter leicht sauren Bedingungen (pH 6,5–7,0) in einem entgasten Puffer in 15 Minuten bei Raumtemperatur (s. Fig. 3). Die Isolierung des fertigen Immunkonjugates vom Reaktionsgemisch kann ebenfalls durch Gelfiltration vorgenommen werden.

Vor dem Einsatz des Immunkonjugates müssen dann die funktionelle Aktivität des konjugierten Antikörpers und die molaren Verhältnisse von moAb zu konjugiertem Staurosporine geprüft werden.

Die erhaltenen Immunkonjugate sind biochemisch im Blut relativ stabil, im Inneren der Zielzellen (Leukozyten) jedoch so labil (lysosomale Enzyme), daß gewährleistet ist, daß die so gekoppelten Hemmstoffe sich im Zellinneren vom monoklonalen Antikörper (moAb) lösen können.

Dadurch kann bei parenteraler Anwendung erreicht werden, daß bei niedrigen Blutkonzentrationen dieses Immunkonjugates ein überwiegend spezifischer Effekt auf die Zielzellen ausgeübt wird und die unspezifischen Nebenwirkungen (Leber- oder Nierenschaden) voraussichtlich gering gehalten werden. Vorteilhaft wären — wie bereits oben erwähnt — Hemmstoffe mit sehr kurzer Halbwertszeit im Vergleich zur Halbwertszeit der kovalenten Bindung an die verwendeten Crosslinker.

## Patentanspruch

Immunkonjugate zur Prophylaxe und Therapie von Organschäden bei endzündlichen Prozessen, gekennzeichnet durch die folgende Formel:



Die Bezeichnung "moAb" (monoklonale Antikörper) bezieht sich dabei auf glykosylierte Proteine, die als Immunglobuline bezeichnet werden und sich spezifisch mit Antigenen verbinden. Sie bezieht sich auf alle Klassen von Immunglobulinen (IgG, IgM, IgD, IgA oder IgE) und auf alle Fragmente und chemischen Modifikationen von Immunglobulinen (z. B. Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fv), die leukozyten- oder gefäßendothel-assoziierte Membranantigene spezifisch binden.

"Leukozyten" sind weiße Blutzellen, die Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten umfassen.

Die Bezeichnung "Antigen" bezieht sich auf Glykoprotein- oder Glykopeptid-strukturen, die auf der Zellmembran von Leukozyten oder von Endothelzellen exprimiert sind, oder nach einer Stimulation dieser Zellen exprimiert werden.

Unter "CrosslinkerR" werden zweiwertige organische Reste von Kopplungsreagenzien verstanden, die in der Lage sind, Antikörper und Hemmstoff durch zwei, zum Teil unterschiedliche, funktionelle chemische Gruppen kovalent so zu koppeln, daß die Spezifität des Antikörpers erhalten bleibt und des Hemmstoffes erst intrazellulär nach einer Freisetzung aus dem Immunkonjugat wirksam wird. Das heißt, die Kopplung zwischen Antikörper und Hemmstoff soll während der Zirkulation im Blut so lange stabil bleiben, bis die Immunkonjugate nach Bindung an die entsprechenden Membranrezeptoren der Zielzellen von diesen Zellen aufgenommen sind. Der Hemmstoff soll somit ganz überwiegend erst nach Aufnahme des Immunkonjugates in der Zielzelle unter der Einwirkung von lysosomalen Enzymen freigesetzt werden.

Um die Nebenwirkungen bei einem parenteralen Einsatz dieser Immunkonjugate durch unspezifisch aufge-

nommene Hemmstoffe z. B. in Leber und Niere möglichst gering zu halten, ist es vorteilhaft, die Hemmstoffe gemäß Patentanspruch chemisch so zu derivatisieren, daß ihre Halbwertszeit im Blut auf Minuten bis Stunden begrenzt ist und unterhalb der Halbwertszeit der kovalenten Bindung an die verwendeten Crosslinker liegt.

Die "CrosslinkerR" können z. B. von Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC), m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysulf succinimid-ester (MBS), Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat (SMPB), N,N'-(1,2-Phenyl)dimaleimid, N,N'-(1,4-Phenyl)-dimaleimid, 4,4'-bis(Maleoylamino)-azobenzol, bis(N-Maleimidomethyl)-ester, N,N'-Alkylenbis(Bromacetamid) oder N,N'-Alkylen-bis(Jodacetamid) abgeleitet sein.

"F1" und "F2" bezeichnen die Atome, über die das Immunglobulin "moAb" bzw. der "Hemmstoff" kovalent an den "CrosslinkerR" gebunden wird. Bei der vorzugsweisen Anwendung eines heterobifunktionellen Crosslinkers, mit zwei unterschiedlichen funktionellen Bindungsgruppen, kann z. B. F1 ein Schwefelatom aus einer durch Reduktion von Disulfidbrücken resultierende Sulfhydrylgruppe des moAb sein und F2 ein zur Amid-Bindung dienendes Stickstoffatom eines Staurosporine-derivates darstellen (s. Fig. 1). F1 kann aber auch ein Stickstoffatom sein, wenn die Kopplung an den Crosslinker über eine freie Aminogruppe des moAb erfolgt.

Mit "Hemmstoff" wird eine Substanz aus der Klasse von Enzyminhibitoren oder Antagonisten bezeichnet, die

1. die intrazelluläre Proteinkinase c hemmen, oder
2. einen intrazellulären Calciumanstieg oder das Calcium/Calmodulin-system inhibieren.

Proteinkinase c Inhibitoren sind z. B. Staurosporine und seine möglichen Derivate, sowie Polymyxin B, H-7 und Chlorpromazine.

Zu den Calcium/Calmodulin-inhibitoren gehören z. B. die Substanzen Compound 48/80, Calmidazolium, W-7, Verapamil, Trifluoperazine, TMB-8.

Da die Hemmstoffe eventuell auch direkt an die moAb, bzw. mehrere Hemmstoff-moleküle pro moAb gebunden werden können, wurden  $m = 0 - 1$  bzw.  $n = 1 - 10$  angegeben.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

– Leerseite –



Fig. 1

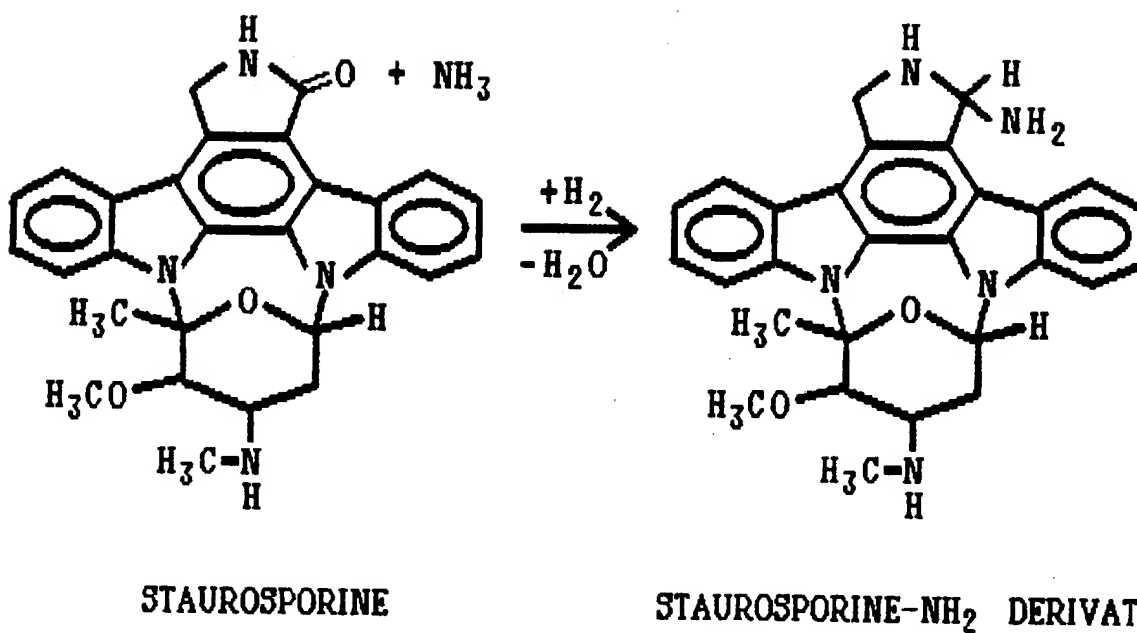


Fig. 2

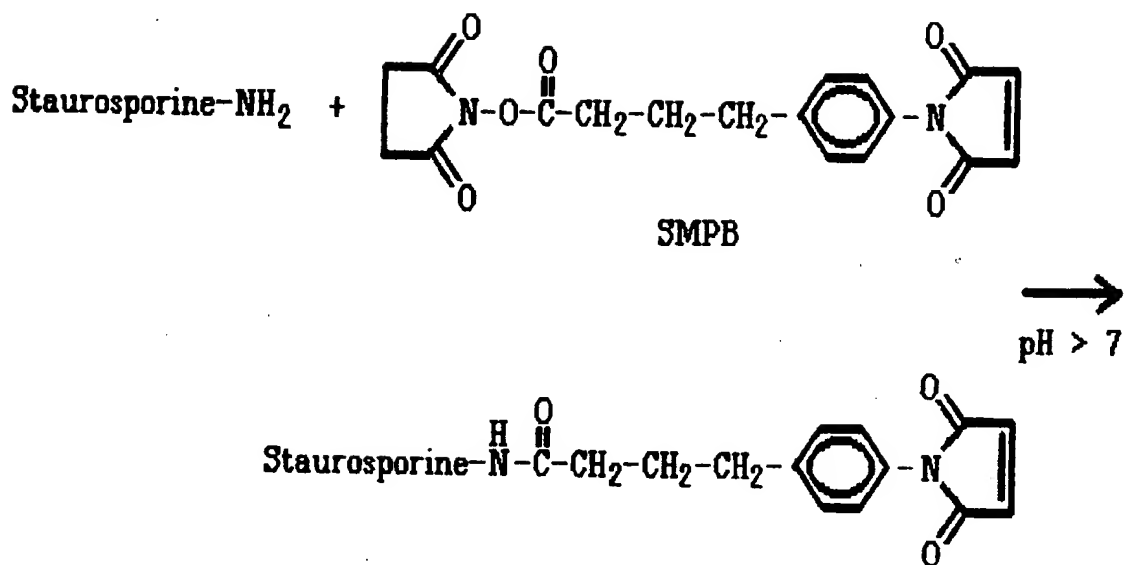
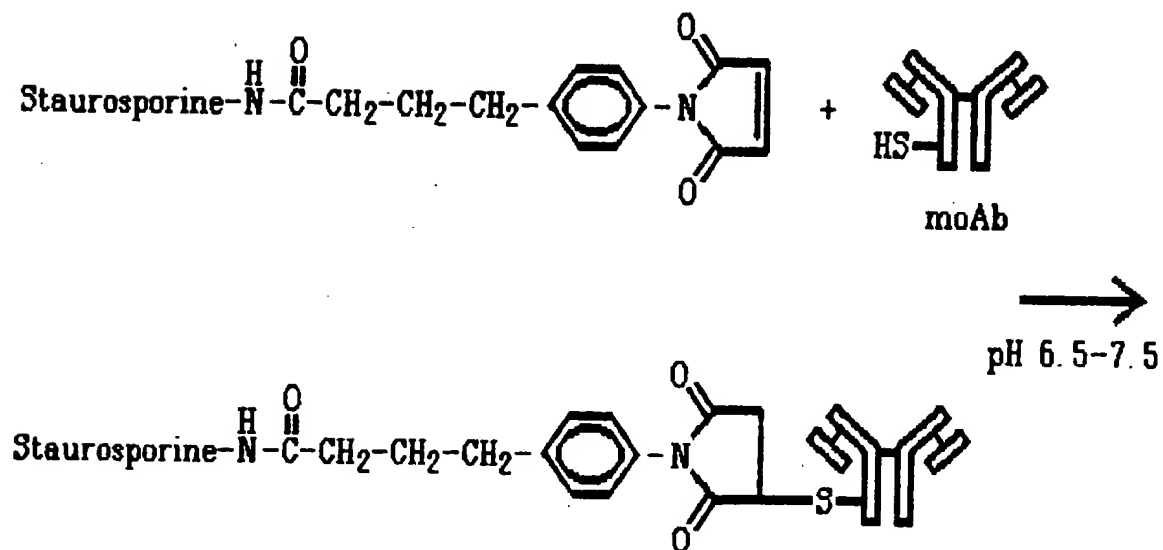


Fig. 3



German Patent No. 40 14 540 A1  
(Offenlegungsschrift)

---

Job No.: 6155-86590

Translated from German by the Ralph McElroy Translation Company  
910 West Avenue, Austin, Texas 78701 USA

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY  
GERMAN PATENT OFFICE  
PATENT NO. 40 14 540 A1  
(Offenlegungsschrift)

Int. Cl.<sup>5</sup>: A 61 K 39/395  
Filing No.: P 40 14 540.9  
Filing Date: May 7, 1990  
Publication Date: November 14, 1991

IMMUNOCONJUGATES FOR PREVENTION AND TREATMENT OF  
ORGAN DAMAGE IN INFLAMMATORY PROCESSES

Inventor: Dr. Klaus Tschaikowsky  
8520 Erlangen, DE

Applicant: Dr. Klaus Tschaikowsky  
8520 Erlangen, DE

Documents Considered for  
Evaluation of Patentability:

DE 35 43 348 A1  
DD 2 11 553  
EP 3 27 169 A2  
EP 1 06 495 A2  
EP 1 04 101 A1  
WO 90 00 562 A1  
WO 85 05 640 A1  
Kubbies, Manred; et al.: Complex  
Ca<sup>2+</sup> flux inhibition as primary  
mechanism of staurosporine-induced  
impairment of T cell activation. In:  
Eur. J. Immunol., 1989, 19(8),  
19:1393-1398  
Ishihara, Noriko; et al.: Stabilization  
of Blood Platelet Microtubular  
System by Staurosporine. In: Life  
Science, Vol. 44, 1989, pp. 1309-  
1316

Brown, Beverly A.; et al.:  
 Conjugation of Metallogthionein  
 [sic; Metallothionein] to a Murine  
 Monoclonal Antibody. In: *Analytical  
 Biochemistry* 172(1), 1988, 22-28  
 Racchetti, Gabriella; et al.:  
 Production of Monoclonal  
 Antibodies to Calcitonin and  
 Development of a Two-Site Enzyme  
 Immunoassay. 24(11), 1987, pp.  
 1169-1176  
 Bjorge, Jeffrey D.; et al.: Inhibition  
 of stimulus-dependent epidermal  
 growth factor receptor and  
 transforming growth factor- $\alpha$  mRNA  
 accumulation by the protein kinase C  
 inhibitor staurosporine. In: *FEBS.  
 Lett.* 243(2), 1989, pp. 819-825  
 Twomey, B.; et al.: The effect of  
 putative protein kinase C inhibitors,  
 K252a and staurosporine, on the  
 human neutrophil respiratory burst  
 activated by both receptor  
 stimulation and post-receptor  
 mechanisms. In: *Brit. J. Pharmacol.*,  
 100(4), 1990, pp. 819-825  
 Biochemical and Biophysical  
 Research Communications, Vol. 164,  
 No. 1, 1989, pp. 339-344  
 Chem. Abstracts, No. 172473h,  
 111(19), 1989, p. 578

Immunoconjugates of monoclonal antibodies, coupling reagents and certain inhibitors are used for prevention and for reduction of organ-damaging inflammatory reactions via cells of the reticuloendothelial system; these immunoconjugates, in contrast to the prior art, are capable of specifically affecting these target cell groups (leukocytes, endothelial cells), even when the inflammatory reaction is already underway. After binding the immunoconjugate to the target cell and subsequent uptake and release of an inhibitor into the interior of the cell, these cells (leukocytes, endothelial cells) become specifically inhibited in their function and interaction, resulting in a reduction of the inflammation-related organ damage.

## Class

The invention concerns the field of immunology. It refers to the development and use of conjugated antibodies (immunoconjugates) that affect, with high selectivity, certain target cells (leukocytes, endothelial cells) in their function and metabolic activity.

The immunoconjugates of this invention interfere with the leukocyte-endothelium interaction and the leukocyte/endothelial cell function and in this way are intended to prevent a major portion of the organ-damaging effects of this portion of the reticuloendothelial system in inflammation processes, especially in sepsis.

## Prior art

The occurrence of sepsis and related multiple organ failure are among the most dreaded complications that follow surgical interventions, infections, trauma, burns, pancreatitis and aspiration, and its treatment is a still unsolved problem.

In spite of significant medical advances, neither the incidence nor the high mortality of these complications has been reduced in recent years. Because of the increasing number of operations on older patients and patients at high risk, in combination with longer interventions, one must expect an increase of septic complications if better methods for early detection and specific treatment are not developed.

Some new, promising treatment concepts were indeed introduced in the last two decades, but mortality rates in cases of sepsis with organ failure have remained as high as before, around 60-80%. The currently available routinely used nonsurgical treatment concepts of postoperative support of breathing (artificial respiration), circulation (catecholamines), nutrition/infusion therapy and antibiotics can be looked on as largely having gone as far as they can go.

The use of generally immunosuppressive substances that have an inhibiting or regulating effect on the immune system (for example, corticosteroids, acetylsalicylic acid) is common and points to the importance of immunosuppression in treatment of intensive care patients. However, when these medications are administered parenterally, they give rise to a variety of organ disorders because of their nonspecific action, so that the use of corticosteroids in particular is considered obsolete according to current ideas (Bihari, D. J. et al. (1982), *B. J. Hosp. Med.* (October):323). However, even the use of newer therapies like PEEP respiration (Pepe, P. et al. (1984) *N. Engl. J. Med.* 311:281), infusions of PGE<sub>1</sub>/PGI<sub>2</sub> prostaglandins (Brockmann, D. C. et al. (1986) *Am. Rev. Respir. Dis.* 134:885; Bihari, D. J. et al. (1988) *Intensive Care Med.* 15:2), hemofiltration, and plasmapheresis have not yet been confirmed through prospective studies.

The basis for the hitherto unsatisfactory success in the treatment of sepsis lies, on the one hand, in the still incomplete understanding of the course of the triggering pathogenic mechanisms over time and, on the other hand, in the still limited possibilities that are available

for specific intervention therein. The initial triggering mechanisms essentially consist of changes of vasomotricity and capillary permeability due to the release of eicosanoids (Demling, R. H. et al. (1981) *Am. J. Physiol.* 240:H348), above all thromboxane and leukotrienes, complement fragments (Heideman, M. (1979)] *Surg. Res.* 26:670), and histamine (Brigham, K. L. et al. (1980) *J. Appl. Physiol.* 49:516). These early-phase reactions are reversible in character and for this reason can be moderated through the administration of cyclooxygenase inhibitors (Adams, T. Jr. et al. (1982) *Circ. shock* 9:481; Huttemeier, P. C. et al. (1982) *Circ. Res.* 50:688), leukotriene antagonists, and antihistamines (Brigham, K. L. et al. (1980) *J. Appl. Physiol.* 49:516).

However, according to current understanding, the development of irreversible endothelial and parenchymal damage which lead to the complete picture of therapy-resistant organ failure assumes the present of activated leukocytes.

A key position here is taken up by sequestered granulocytes and tissue-resident macrophages, which induce and perpetuate complex, tissue-destroying inflammatory phenomena through an excessive local release of lysosomal enzymes, toxic oxygen radicals and inflammation mediators (interleukin 1, TNF).

The system of mononuclear phagocytes in the liver and lungs is primarily responsible for clearing the blood of circulating foreign particles (for example, bacteria, endotoxins).

Therefore, activated macrophages are a primary induction system for recruiting and activating neutrophil granulocytes—the second cellular component of nonspecific immune defense.

The sequestering and "sticking" of activated granulocytes in pulmonary capillaries, as a large number of studies has confirmed, is a crucial prerequisite for the development of the complete picture of acute pulmonary failure (Tate, R. M. et al. (1983) *Am. Rev. Respir. Dis.* 128:552; Meyrick, B. et al. (1983) *Lab. Clin. Invest.* 48:458; Worthen, G. S. et al. (1987) *Am. Rev. Respir. Dis.* 136:19; Weiland, J. E. et al. (1986) *Am. Rev. Respir. Dis.* 133:218; Warshawski F. J. et al. (1986) *Am. Rev. Respir. Dis.* 133:797).

The working groups of Brigham, Malik and Hohn have impressively demonstrated that animals made neutropenic before the administration of endotoxin or activated complement or before microembolization do not react with an increase of the permeability and pulmonary blood pressure and do not develop lethal pulmonary failure (Barie, P. S. et al. (1982) *Am. Rev. Respir. Dis.* 126:904; Heflin, A. C. Jr. et al. (1981) *J. Clin. Invest.* 68:1253; Johnson, A. et al. (1982) *J. Appl. Physiol.* 52:155; Hohn, D. C. et al. (1980) *Surgery* 88:48). Two mutually interconnecting pathogenic mechanisms are responsible for the massive persistent sequestering of granulocytes:

A increasing targeted inflow of leukocytes into the focus of inflammation (chemotaxis) and increased adherence of the leukocytes to the vascular endothelium (sticking).

The chemotactic inflow is mediated by factors (chemotaxins) such as complement fragment C5a and leukotriene LTB<sub>4</sub>, which are produced in inflammation and traumatic processes.

The following factors are causally involved in the second pathogenic mechanism in the genesis of sepsis-induced organ failure—leukocyte sticking in the capillary circulation system:

1. Reduced blood flow velocity as a consequence of initial disturbances of vasomotricity, of microthrombi or—like a vicious circle—leukocyte sticking itself (Lawrence, M. B. et al. (1987) *Blood* 70:1284).

2. Reduced intracellular content of cAMP and thus reduced cytosol viscosity in reaction to inflammation mediators (Chopra, J. et al. (1988) *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:915).

3. The expression of adherence-promoting glycoprotein structures on the granulocyte/monocyte membrane, especially CD11/w18 antigen (CR3 receptor), which, besides the contact with the capillary endothelium, also mediates increased opsonization of C3b<sub>i</sub>-laden particles (Pohlmann, T. H. et al. (1986) *J. Immunol.* 136:4548).

4. The expression of adherence-promoting glycoprotein structures on the endothelial cell membrane, likewise in reaction to inflammation mediators (TNF, interleukin 1, GM-CSF) (Bevilacqua, M. P. et al. (1985) *J. Clin. Invest.* 76:2003).

The last two pathogenically relevant factors, the adherence-mediating glycoprotein structures on the cell membrane, form, as it were, the characteristic contact bridges between leukocytes and endothelium.

Adherence-mediating glycoproteins were detected on the cell membrane of endothelial cells; these glycoproteins, after stimulation by mediators (e.g., IL-1, TNF), are synthesized de novo and are expressed at the cell membrane with a lag phase of 6-8 h (Bevilacqua, M. P. et al. (1985) *J. Clin. Invest.* 76:2003).

On the cell membrane of leukocytes, the CD11/w18 antigen above all is an important glycoprotein structure, via which adherence of leukocytes to the endothelium is mediated. The CD11/w18 antigen, also called the CR3 receptor, is a heterotrimer of CD11 and CDw18 antigens, which is permanently expressed at the cell membrane of granulocytes and monocytes and, similar to the FMLP receptor, can multiply within a few minutes in response to inflammation mediators (e.g., TNF) (Socinski, M. A. et al. (1988) *Blood* 72:691; Berger, M. et al. (1984) *J. Clin. Invest.* 74:1566).

According to in vivo tests, the expression of the CD11/w18 antigen on the granulocyte and monocyte membrane is a basic prerequisite for the aggregation of leukocytes and their adherence to endothelial monolayers (Beatty, P. G. et al. (1984) *Lancet* 1:535; Harlan, J. M. et al. (1985) *Blood* 66:167; Schwartz, B. R. et al. (1985) *Blood* 65:1553).



Monoclonal antibodies to epitopes of this CD11/w18 antigen can inhibit, for example, the adherence of granulocytes on the epithelium by 70-90% (Marks, R. M. et al. (1989) *Nature* 339:314).

In his own research the applicant found that CD11b expression is stimulated by C5a and PMA (phorbol myristate acetate) and that the adherence of neutrophils to plasma-coated plastic surfaces can be reduced by more than 50% by monoclonal anti-CD11b antibodies. It was shown on animal models that granulocyte adherence can also be reduced in vivo by 80-90% through the administration of monoclonal anti-CDw18 antibodies (MoAb 60.3) (Arfors, K. E. et al. (1987) *Blood* 69:338). Surprisingly, even mortality in a hemorrhagic shock model (rabbits) was quite significantly reduced through the administration of monoclonal anti-CDw18 (MoAb60.3) (Vedder, N. B. et al. (1988) *J. Clin. Invest.* 81:939).

Thus, it could be achieved through the use of these leukocyte-specific monoclonal antibodies that leukocytes that are attracted to a focus of infection by the chemotactic stimuli (see above) cannot adhere to the vascular endothelium of the inflamed organ via the CD11/w18 antigen as contact bridge.

Through this the extent of the cellular infiltration by leukocytes into these organs and the resulting inflammatory reaction that a local tissue lesion can produce would be distinctly reduced.

Besides the CD11/w18 antigen, still other glycoprotein structures on leukocytes were described that can mediate endothelial adherence through interaction with tissue-specific endothelial determinants (Lewinsohn et al. (1987) *J. Immunol.* 138:4313).

These various adherence-promoting glycoprotein structures on the cell membrane of the endothelium and the leukocytes can for this reason be sufficiently neutralized only through the administration of several monoclonal antibodies.

In addition, at the beginning of treatment in the hospital, only a fraction of patients are in an early stage of sepsis. Ongoing inflammatory reactions of the endothelium or the leukocytes, which are already adhering to the vascular endothelium or have infiltrated the tissue, cannot be prevented or suppressed either with the help of the currently available antibodies described above nor with other methods that specifically act on the leukocytes or the endothelium.

#### Problem and solution

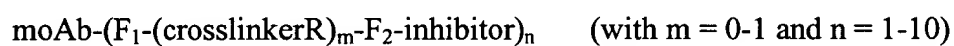
The present invention is based on the problem of inhibiting both the adherence of leukocytes at the focus of inflammation and thus inhibiting the related inflammatory reactions and also specifically to reduce the production and release of injurious inflammation factors (lysosomal enzymes, oxygen radicals, eicosanoids, cytokines) via already adhering leukocytes and vascular endothelial cells altered by inflammation.

This invention is thus intended to reduce inflammatory processes, especially in the case of sepsis, through targeted immunosuppression, both prophylactically and in an early stage, as well as in an already fully developed inflammatory process.

This problem is solved in accordance with the invention by using immunoconjugates in accordance with the claim that are specific to membrane antigens of leukocytes or endothelial cells to transport an inhibitor (protein kinase C inhibitor or a calcium/calmodulin antagonist) largely to these target cells, which [inhibitor] is intended to reduce the production and release of inflammation mediators by these target cells after being absorbed into them.

The immunoconjugates of this invention differ from other previously known immunoconjugates for tumor treatment (e.g., Moolten, F. L. et al. (1975) J. Natl. Cancer Institute 55:473; Thorpe, P. E. et al. (1978) Nature 271:752) through a completely novel purpose of use, through the inhibitors, or toxins, that are used and the effect that is achieved this way and the type of target cells that are affected.

The term "immunoconjugate" and the subject of this invention refer to covalent compounds of monoclonal antibodies, crosslinkers and inhibitors that are capable of specifically affecting the function of leukocytes or endothelial cells and/or inhibiting these cells in the leukocyte/endothelium interaction and that can be characterized by the following formula:



The term "moAb" (monoclonal antibodies) refers to glycosylated proteins, which are characterized as immunoglobulins and bond specifically to antigens. They refer to all classes of immunoglobulins (IgG, IgM, IgD, IgA or IgE) and to all fragments and chemical modifications of immunoglobulins (for example Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fv), that specifically bind leukocyte- or endothelium-associated membrane antigens.

The antibodies that are used serve, as it were, as vehicles to carry the covalently coupled inhibitor to specific target cells (leukocytes, endothelial cells) and to promote the intracellular uptake (phagocytosis) of the inhibitor into the target cells.

The method for producing monoclonal antibodies by hybridoma technology is well known and follows the method of Köhler and Milstein (1975) Nature 356:497 and Levy and Dilley (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4211.

In correspondence with this invention, antibodies that are specific for leukocyte or endothelial membrane antigens that are involved in the leukocyte-endothelium interaction should preferably be used for these immunoconjugates. These include, e.g., monoclonal antibodies or their Fab fragments (see above) to the CD11/w18 antigen on granulocytes and monocytes. The use of Fab fragments in the production of immunoconjugates is to be preferred in accordance with the invention, since in contrast to complete antibodies they do not activate complement due

to the missing Fc fragment, do not bind to the cell membranes via the Fc receptor, and trigger lower heteroantigenicity in the recipient.

"Leukocytes" are white blood cells, which include granulocytes, monocytes/macrophages and lymphocytes.

The term "antigen" refers to glycoprotein or glycopeptide structures that are expressed on the cell membrane of leukocytes or endothelial cells or are expressed after stimulation of these cells.

"CrosslinkerR" is understood to mean divalent organic residues of coupling reagents that are capable of coupling antibodies and inhibitors by two, in some cases different, functional chemical groups covalently so that the specificity of the antibody continues to exist and the inhibitor becomes effective intracellularly only after release from the immunoconjugate. This means that the coupling between the antibody and inhibitor is to remain stable during circulation in the blood until the immunoconjugates, after binding to the appropriate membrane receptors on the target cells, are taken up by these cells. The inhibitor is thus for the most part not supposed to be released until after uptake of the immunoconjugate and to the target cell under the effect of lysosomal enzymes.

In order to keep side effects due to nonspecifically absorbed inhibitors in the case of parenteral use of these immunoconjugates, for example in the liver and kidneys, as low as possible it is advantageous to derivatize chemically the inhibitors in accordance with the claim so that their half-life in the blood is limited to minutes to hours and is less than the half-life of the covalent bond to the crosslinker that is used.

The "crosslinkerR" can be derived from, for example, succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester (MBS), succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate (SMPB), N,N'-(1,2-phenylene)dimalimide, N,N'-(1,4-phenylene)dimalimide, 4,4'-bis(maleoylamino)azobenzene, bis(N-maleimodomethyl) ester, N,N'-alkylenebis(bromoacetate amide) or N,N'-alkylenebis(iodacetamide).

"F<sub>1</sub>" and "F<sub>2</sub>" designate the atoms via which the immunoglobulin "moAb" or the "inhibitor" are covalently bonded to the "crosslinkerR." In the preferred use of a heterobifunctional crosslinker, with two different functional binding groups (in order to reduce the binding of moAb-moAb conjugates or inhibitor-inhibitor conjugates), e.g., F<sub>1</sub> can be a sulfur atom from a sulfhydryl group of the moAb resulting from reduction of disulfide bridges and F<sub>2</sub> represents a nitrogen atom of a staurosporine derivative serving for amide bonding (see Figure 1).

F<sub>1</sub>, however, can also be a nitrogen atom if the coupling to the crosslinker takes place via a free amino group of the moAb.

The use of heterobifunctional crosslinkers allows the stepwise preparation of immunoconjugates by known methods, where, for example, first the inhibitor and then the moAb are bonded to the crosslinker (Lomants, A. J. et al. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 167:311; Anjaneyula, P. S. R. et al. (1987) Int. J. Pep. Pro. Res. 30:117; Partis, M. D. et al. (1983) J. Pro. Chem. 2:263; Weltman, J. K. et al. (1983) Bio Techniques 1:148).

If the moAb is supposed to be bound via a free amino group and the inhibitor via the free sulfhydryl group when using heterobifunctional crosslinkers that can react both with free amino and sulfhydryl groups, the possible free sulfhydryl groups in the immunoglobulin moAb must be blocked, for example, by N-ethylmaleimide. If the binding of the immunoglobulin moAb to the crosslinker takes place via a free sulfhydryl group, free SH groups must be generated in the moAb by reduction of disulfide bridges. The number of the freely available SH groups can be calculated, for example, by the reaction with Ellman's reagent. The coupling reaction to a maleimide crosslinker then takes place under neutral to slightly acid pH conditions in an SH-free, degassed buffer within minutes.

The final product (immunoconjugate), after the end of the second coupling reaction, is isolated from the reaction mixture by gel filtration or dialysis.

Since the inhibitors can possibly also be bonded directly to the moAb or several inhibitor molecules per moAb,  $m = 0-1$  or  $n = 1-10$  was specified.

"Inhibitor" means a substance from the class of enzyme inhibitors or antagonists that

1. inhibit intracellular protein kinase C, or
2. inhibit an intracellular calcium increase or the calcium/calmodulin system.

Protein kinase C inhibitors are, for example, staurosporine and its possible derivatives as well as polymyxin B, H-7 and chlorpromazine.

Calcium/calmodulin inhibitors include, for example, the substances compound 48/80, calmidazolium, W-7, verapamil, trifluoperazine, TMB-8.

Staurosporine is an alkaloid and is produced by fungi of the genus *Streptomyces*. Staurosporine was initially known because of its antibiotic properties (Omura, S. et al. (1977), J. Antibiot. 30:275) and is considered today to be the most powerful ( $IC_{50} = 2.7$  nM) protein kinase C inhibitor (Tamaoki, T. et al. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 135:387). Moreover, it has been reported that this substance also inhibits cAMP-dependent protein kinase.

The intracellular uptake of about 2000 molecules of staurosporine per target cell (10 pL) would be sufficient, e.g., to inhibit the activity of intracellular protein kinase C by about 50%.

Through the inhibition of this important key enzyme the activation (phosphorylation) of a series of other enzymes (NADPH-dependent membrane oxidase, phospholipase  $A_2$ , etc.), which induce production of inflammation mediators (oxygen radicals, leukotrienes) is then reduced.

The thus defined immunoconjugates of this invention are intended to be used parenterally in humans and mammals with appropriate indications while protecting the recipient with antibiotics in order to prevent the spread of a bacterial infection.

For this the immunoconjugate has to be put into an injectable form (solution, suspension, emulsion) using acceptable vehicles (e.g., electrolyte-containing or protein-containing aqueous solutions or oil-containing emulsions). The vehicle solution can possibly contain additives (buffers, preservatives) that ensure the stability and isotonicity of this immunoconjugate solution.

The immunoconjugates are to be infused at specific concentration (e.g., 0.1-50 mg/mL) at specific time intervals. The concentration in the blood that is achieved in this way should in this case be high enough that enough immunoconjugates are taken up by the circulating and adhering target cells (leukocytes, endothelium) to achieve the desired inhibiting effect, but as low as possible in order to minimize toxic side effects (liver and kidney damage) due to nonspecific uptake of the inhibitor.

The use of the immunoconjugates of this invention thus enables for the first time fulminant inflammatory reactions in the body, which can lead to functional disturbances and injuries to organs, to be reduced selectively and in a targeted manner through an inhibition of certain cell groups (leukocytes, endothelium) that are involved in the development of these inflammatory reactions.

## Examples

### Example 1

#### Derivatization of the protein kinase C inhibitor staurosporine

The alkaloid staurosporine, whose structural formula is given in drawing 1 (see Figure 1) can be derivatized in various ways in order to be covalently coupled by means of a crosslinker to a monoclonal antibody (or a fragment thereof) to leukocyte or endothelial antigens in accordance with the claim.

The reductive amination of the carbonyl group of staurosporine to a primary amine is shown here (see Figure 1):

1 mol staurosporine is dissolved in 500 mL methanol that has been saturated at 10°C with ammonia (about 5.5 mol). After the addition of Raney nickel, 30 g alloy is hydrogenated in a shaker autoclave at 90°C and 100 atm. Then the pressure is released and the catalyst filtered out and the excess ammonia is distilled out. The supernatant is acidified, the nonbasic compounds are separated by etherification and the ether solution is then dried over potassium hydroxide. After evaporating out the solvent, distillation is carried out via a 20 cm Vigreux column.

After derivatization to primary amine, tests must be carried out to see how high the inhibiting effect of the resulting staurosporine derivative on protein kinase C is.

Staurosporine can also be aminated by a milder reaction (cyanohydrin synthesis followed by Bouveault-Blanc reduction) if the reaction conditions are too drastic for the staurosporine and the activity of the final product is too low because of this.

### Example 2

Preparation of an immunoconjugate from monoclonal anti-MAC1 antibodies, SMPB and aminated staurosporine

An aminated staurosporine derivative (see Figure 1) is coupled in a first reaction step via its primary amino group in a slightly alkaline buffer (pH 7.0-7.5) which does not contain any free sulfhydryl or amino groups, to the N-hydroxysuccinimide group of the heterobifunctional crosslinker succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate (SMPB) (see Figure 2). The molar staurosporine:SMPB ratio in the reaction mixture is about 1:10.

Excess crosslinker is removed from the conjugated staurosporine derivative by gel filtration.

Before the second reaction step the anti-MAC1 antibody that is used (anti-CD11b) has to be reduced with 25 mM dithiothreitol (DTT) in 0.01M phosphate buffer (PBS) (pH 7.5) in order to generate free sulfhydryl groups. The excess DTT is also removed by gel filtration.

The second reaction step, the thioether bonding of the antibody to the crosslinker SMPB via a free sulfhydryl group, for preparation of the complete immunoconjugate then takes place under slightly acidic conditions (pH 6.5-7.0) in a degassed buffer over 15 min at room temperature (see Figure 3). The isolation of the prepared immunoconjugate from the reaction mixture can likewise be carried out by gel filtration.

Before use of the immunoconjugate, the functional activity of the conjugated antibody and the molar ratio of moAb to conjugated staurosporine must be tested.

The resulting immunoconjugates are biochemically relatively stable in blood, but within the target cell (leukocytes) they are so labile (lysosomal enzymes) that it is guaranteed that the thus coupled inhibitors can separate from the monoclonal antibody (moAb) in the cell interior.

In this way a predominantly specific effect on the target cells can be produced with parenteral administration, with low immunoconjugate blood concentrations, and it is expected that the nonspecific side effects (liver or kidney damage) can be kept low. As already noted, inhibitors with very short half-life in comparison to the half-life of the covalent bond to the crosslinkers that are used would be advantageous.

### Claim

Immunoconjugates for prevention and treatment of organ damage in inflammatory processes, characterized by the following formula



The term "moAb" (monoclonal antibodies) refers to glycosylated proteins, which are characterized as immunoglobulins and bond specifically to antigens. They refer to all classes of immunoglobulins (IgG, IgM, IgD, IgA or IgE) and to all fragments and chemical modifications of immunoglobulins (e.g., Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fv), that specifically bind leukocyte- or vascular endothelium-associated membrane antigens.

"Leukocytes" are white blood cells, which include granulocytes, monocytes/macrophages and lymphocytes.

The term "antigen" refers to glycoprotein or glycopeptide structures that are expressed on the cell membrane of leukocytes or endothelial cells or are expressed after stimulation of these cells.

"CrosslinkerR" are understood to mean divalent organic residues of coupling reagents that are capable of coupling antibodies and inhibitors by two, in some cases different, functional chemical groups covalently so that the specificity of the antibody continues to exist and the inhibitor becomes effective intracellularly only after release from the immunoconjugate. This means that the coupling between the antibody and inhibitor is to remain stable during circulation in the blood until the immunoconjugates, after binding to the appropriate membrane receptors on the target cells, are taken up by these cells. The inhibitor is thus for the most part not to be released until after uptake of the immunoconjugate and to the target cell under the effect of lysosomal enzymes.

In order to keep side effects due to nonspecifically absorbed inhibitors, for example in the liver and kidneys, low in the case of parenteral use of these immunoconjugates, it is advantageous to derivatize chemically the inhibitors in accordance with the claim so that their half-life in the blood is limited to minutes to hours and is less than the half-life of the covalent bond to the crosslinker that is used.

The "crosslinkerR" can be derived from, e.g., succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester (MBS), succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate (SMPB), N,N'-(1,2-phenylene)dimalimide, N,N'-(1,4-phenylene)dimalimide, 4,4'-bis(maleoylamino)azobenzene, bis(N-maleimodomethyl) ester, N,N'-alkylenebis(bromoacetate amide) or N,N'-alkylenebis(iodacetamide).

"F<sub>1</sub>" and "F<sub>2</sub>" designate the atoms via which the immunoglobulin "moAb" or the "inhibitor" are covalently bound to the "crosslinkerR." In the preferred use of a heterobifunctional crosslinker, with two different functional binding groups, e.g., F<sub>1</sub> can be a sulfur atom from a sulfhydryl group of the moAb resulting from reduction of disulfide bridges and F<sub>2</sub> represents a nitrogen atom of a staurosporine derivative serving for amide bonding (see

Figure 1). F<sub>1</sub>, however, can also be a nitrogen atom if the coupling to the crosslinker takes place via a free amino group of the moAb.

"Inhibitor" means a substance from the class of enzyme inhibitors or antagonists that

1. inhibit intracellular protein kinase C, or
2. inhibit an intracellular calcium increase or the calcium/calmodulin system.

Protein kinase C inhibitors are, e.g., staurosporine and its possible derivatives as well as polymyxin B, H-7 and chlorpromazine.

Calcium/calmodulin inhibitors include, for example, the substances compound 48/80, calmidazolium, W-7, verapamil, trifluoperazine, TMB-8.

Since the inhibitors can possibly also be bound directly to the moAb or several inhibitor molecules per moAb, m = 0-1 or n = 1-10 was specified.

Figure 1

Key: 1      Staurosporine-NH<sub>2</sub> derivative



Figure 2

Figure 3